Elucigene® CF30v2
Mode d'emploi

No de catalogue. - CF030B1 – 25 tests avec AmpliTaq Gold

IVD Dispositif de diagnostic in vitro

Fabriqué par:
Elucigene Diagnostics
Greenheys House
Pencroft Way
Manchester Science Park
Manchester
M15 6JJ

CE

Pour joindre le service des ventes, le service à la clientèle et le service technique :
T: +44 (0) 161 669 8122
F: +44 (0) 161 669 8129
E: enquiries@elucigene.com
E: techsupport@elucigene.com

Elucigene Diagnostics is the trading name of Delta Diagnostics (UK) Limited, a company registered in England and Wales, registration number 8696299.

Elucigene CF30v2

Usage prévu

Détection qualitative simultanée in vitro des mutations suivantes du gène *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator, responsable de la mucoviscidose) dans de l'ADN extrait à partir d'échantillons de sang total (préservé par EDTA) et de spots de sang séché (Guthries).

Traditional	HGVS Nomenclature[1]	
	cDNA name	Protein name
E60X	c.178G>T	p.Glu60*
G85E	c.254G>A	p.Gly85Glu
394delTT	c.262_263del (c.262_263delTT)	p.Leu88Ilefs*22
Y122X	c.366T>A	p.Tyr122*
621+1G>T	c.489+1G>T	
711+1G>T	c.579+1G>T	
1078delT	c.948del(c.948delT)	p.Phe316Leufs*12
R334W	c.1000C>T	p.Arg334Trp
R347P	c.1040G>C	p.Arg347Pro
A455E	c.1364C>A	p.Ala455Glu
I507del	c.1519_1521del (c.1519_1521delATC)	p.Ile507del
F508del	c.1521_1523del (c.1521_1523delCTT)	p.Phe508del
1717-1G>A	c.1585-1G>A	
G542X	c.1624G>T	p.Gly542*
G551D	c.1652G>A	p.Gly551Asp
R553X	c.1657C>T	p.Arg553*
1811+1.6kbA>G	c.1680-886A>G	
2183AA>G	c.2051_2052delAAinsG	p.Lys684Serfs*38
W846X	c.2538G>A	p.Trp846*
2789+5G>A	c.2657+5G>A	
3120+1G>A	c.2988+1G>A	
3272-26A>G	c. 3140-26A>G	
Y1092X(C>A)	c.3276C>A	p.Tyr1092*
R1162X	c.3484C>T	p.Arg1162*
3659delC	c.3528del (c.3528delC)	p.Lys1177Serfs*15
3849+10kbC>T	c.3718-2477C>T	
S1251N	c.3752G>A	p.Ser1251Asn
W1282X	c.3846G>A	p.Trp1282*
N1303K	c.3909C>G	p.Asn1303Lys

[1] en reference à– Mutation Nomenclature in Practice: Findings and Recommendations from the Cystic Fibrosis External Quality Assessment Scheme. Berwouts S, Morris M, Girodon G, Schwarz M, Stuhrmann M and Dequeker E. Human Mutation, Vol.00, No. 0, 1-7 (2011)*

A noter que les mutations vont être exprimées en nomenclature traditionnelle dans le reste de ce document. La nomenclature HGVS est fournie dans ce tableau comme référence, et devra être utilisée dans les rendus des résultats

Principes de procédure

La méthode employée par le kit CF30v2 ELUCIGENE™ fait appel à la technique d'amplification spécifique d'allèles ARMS™ qui détecte des mutations ponctuelles ou de petites délétions dans l'acide désoxyribonucléique (ADN). Cette technologie est basée sur le fait que les oligonucléotides présentant un résidu en 3' mal apparié ne fonctionneront pas comme amorces de la Polymerase Chain Reaction (PCR) dans les conditions spécifiées, ce qui est expliqué sous forme schématique sur la Figure 1. La sélection des oligonucléotides appropriés permet d'amplifier et de détecter des séquences d'ADN mutantes ou normales spécifiques.

Mise en garde et précautions

1. Le contrôle d'ADN normal fourni avec ce kit a été testé indépendamment et est négatif pour le virus de l'hépatite B (HBV), le virus de l'hépatite C (HCV) et le virus d'immunodéficience humaine (VIH) 1 et 2

2. Tout matériel d'origine humaine doit être manipulé avec précaution. Tous les échantillons doivent être considérés comme potentiellement infectieux. Aucune méthode de test ne permet de garantir complètement que les agents infectieux HBV, HCV, VIH ne sont pas présents.

3. La manipulation des échantillons et des composants de test, leur utilisation, stockage et élimination doivent être exécutés en conformité avec les procédures définies par les régulations et directives nationales de sécurité et de risques biologiques.

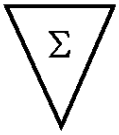
4. Conformément aux bonnes pratiques, les laboratoires doivent traiter leurs propres échantillons internes de CQ de génotype connu avec chaque série de test, de manière à valider de la procédure.

5. Si le carton du kit est endommagé, le contenu risque de l'être aussi endommagé; ne pas utiliser le kit et contacter le service clientèle.

Symboles utilisés sur les étiquettes

Les symboles utilisés sur toutes les étiquettes et les emballages sont conformes au standard harmonisé ISO15223

Fabricant



Nombre de tests

Voir instructions d'utilisation

Conserver en dessous de la température donnée

A utiliser avant la date donnée

Code du catalogue

Numéro du lot ou paquet

Dispositif médical de diagnostic in vitro

Matériel fourni

Conserver tous les composants a –20°C. Après ouverture, ne pas conserver plus de 3 mois les réactifs, à moins qu'ils n'aient été aliquotés.

1. 1 fiole x 500µL chacune de 4 mélanges d'amorces TA,TB,TC et TD (404466, 404467, 404468 et 404469) contenant les amorces pour détecter les 29 mutations CFTR suivantes : Y1092X, 1717-1G>A, G542X, W1282X, N1303K, F508del, 3849+10kbC>T, 394delTT, 621+1G >T, R553X, G551D, R1162X, R334W, A455E, 2183AA>G, 3659delC, 1078delT, I507del, R347P, S1251N, E60X, 1811+1.6kbG>A, 3272-26A>G, 3120+1G>A, 2789+5G>A, 711+1G>T, G85E, Y122X et W846X. Chaque mélange d'amorces contient également les amorces de contrôle et les triphosphates désoxynucléotides dans un tampon. Suffisant pour 25 fioles de tests
2. 1 fiole x 200µL de tampon de dilution (404482) (DB)
3. 1 fiole x 600µL de colorant de charge (404481) (LD) pour 25 tests
4. 1 fiole x 50µL d'AmpliTaq Gold (404490) (AG) suffisant pour 25 tests
5. 1 x fiole (50µL) de contrôle d'ADN (404487) (DC) normal pour les mutations détectées par l'Elucigene CF30v2.

25 fioles PCR de couleurs (orange, violet, vert et bleu) sont disponibles sur demande.

Matériel nécessaire mais non fourni

Préparation d'ADN – une eau déminéralisée stérile de bonne qualité; chlorure de sodium (NaCl); sel disodique d'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA); pastilles d'hydroxyde de sodium (NaOH); 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol cristallisé (base Tris); acide chlorhydrique à 36% d.1.18 (HCl); chlorure d'ammonium (NH_4Cl).

Amplification PCR - Huile de vaseline blanche Sigma[(a)]; eau distillée stérile de bonne qualité.

(a) Pour des amplifications effectuées dans des fioles PCR de 0.5ml ou des thermocycleurs sans couvercles chauffants.

Electrophorèse – Matériel et réactifs pour électrophorèse en gel, incluant de l'Agarose NuSieve 3:1 (Lonza), un marqueur de poids moléculaire 1 kb (avec une échelle de 50 pb), et du bromure d'éthidium.

Matériel nécessaire

Générale

Consommables de laboratoire - gants; tubes à capuchon vissant pour micro centrifugeuse, portoir à tube; pointes de pipette.

Equipement de laboratoire – pipettes de précision (2 jeux: 1 pour la manipulation avant amplification et 1 pour la manipulation après amplification:- des pipettes à déplacement positif); vêtements de protection; agitateur vortex; micro centrifugeuse; balance.

Préparation ADN –Bloc chauffant (à 100°C)

Amplification PCR - Thermocycleur capable de contenir les fioles de 0.5ml ou 0.2ml (avec une température précise de +/-1,0°C entre 33°C et 100°C et une uniformité de température statique de +/-1°C), couvercle chauffant optionnel.

Electrophorèse – cuve pour gels horizontaux; bloc d'alimentation; four à micro-ondes; bain marie pour refroidir la gélose; transilluminateur à UV; appareil photo.

Collecte et stockage des échantillons

Des échantillons de sang total sur EDTA ou de taches de sang séchées peuvent être utilisés Il a été observé dans certains cas que la méthode de collecte et de traitement des échantillons pouvait avoir une influence sur la qualité des résultats [9]. Il est recommandé que chaque utilisateur s'assure que le matériel et la technique choisis soient utilisés conformément aux instructions du fabricant et que le matériel de prélèvement et la technique de préparation de l'ADN soient compatibles avec le test.

Les échantillons de sang doivent être conservés à -20°C avant la préparation de l'ADN. Eviter les cycles de congélation-décongélation.

Echantillons de sang (EDTA)

Préparation de l'ADN des échantillons de sang entier (EDTA)

1. Pipeter 80µL de chaque échantillon de sang dans un microtube à bouchon à vis.
2. Pipeter 320µL de 170mM (9.09 g/L) de solution NH_4Cl dans chaque tube.
3. Mélanger pendant 20 minutes en remuant et inversant doucement. Eviter d'agiter fort et de former de la mousse.
4. Centrifuger chaque tube pendant 2 minutes à 12 000g jusqu'à ce qu'un culot de cellules se forme.
5. Utiliser une pipette pour enlever et jeter le liquide surnageant.
6. Pipeter 300µL de solution de NaCl-EDTA 10mM (0.58g/L - 3.72g/L) dans chaque tube et vortexer afin de remettre les cellules en suspension.
7. Centrifuger chaque tube pendant 1 minute à 12 000g jusqu'à ce qu'un culot de cellules se forme.
8. Répéter les étapes 5 à 7 au moins deux fois jusqu'à ce que le surnageant soit clair.
9. Utiliser une pipette pour enlever et jeter le liquide surnageant.
10. Pipeter 200µL de solution de NaOH 50mM (2g/L) dans chaque tube et vortexer afin de remettre les cellules en suspension.
11. Incuber dans un bloc chauffant à 100°C pendant 10 minutes.
12. Pipeter 40µL de Tris-HCl 1M pH7.5 dans chaque tube et vortexer.
13. Ajouter 1ml d'eau déminéralisée stérile dans chaque tube afin d'obtenir un volume total d'échantillon d'ADN de 1.24ml.
14. Centrifuger chaque tube pendant 1 minute à 12 000g jusqu'à ce qu'un culot de débris cellulaires soit visible. L'ADN est contenu dans le surnageant.

Préparation de l'ADN à partir de taches de sang séchées

1. A l'aide d'un poinçon, découper des disques[(b)] de 2mm x 3 mm dans le carton imbibé de sang les mettre dans des tubes 1.5ml à bouchon à vis.

   Ces disques doivent provenir d'une partie de la carte qui est complètement saturée de sang. Poinçonner plusieurs disques sur une carte vierge entre chaque échantillon afin d'éviter toute contamination inter-échantillon.

2. Ajouter 1ml de NaCl-EDTA 10mM (0.58g/L - 3.72g/L) dans chaque tube et mélanger sur un mixeur rotatif pendant 15 - 20 minutes. S'il n'y a pas de mixeur rotatif, les lavages doivent être prolongés jusqu'à 30 minutes chacun.
3. Prélever et jeter la solution de lavage.
4. Répéter les étapes 2 et 3 une fois de plus.
5. A ce point, la plupart des pigments de l'hème doit être éluée du disque. Une faible coloration marron rouge des poinçons de buvard n'est pas anormale à ce stade.
6. Micro centrifuger rapidement (3 secs) pour collecter ce qu'il reste de la solution de lavage au fond du tube. Utiliser une pipette pour enlever et jeter le maximum de solution de lavage.
7. Cette brève étape de micro centrifugeuse permet normalement de retirer ce qu'il reste des pigments de l'hème.
8. Ajouter 150µL de 50mM (2g/L) NaOH à chaque tube. Remuer gentiment.
9. Incuber dans un bloc chauffant à 100°C pendant 10 minutes.
10. Micro centrifuger brièvement (2s) pour récolter le surnageant présent dans le bouchon.
11. Ajouter 30µL de Tris-HCl 1M pH 7.5 dans chaque tube, pour neutraliser, et mélanger soigneusement.
12. Ajouter 420µL d'eau déminéralisée stérile à chaque échantillon d'ADN pour obtenir un volume total de 600µL.
13. Bien mélanger les échantillons et les micro centrifuger pour collecter.
14. Transférer le surnageant dans un tube à capuchon vissant propre et étiqueté.

Conserver l'ADN extrait à -20^{0}C.

(b) La surface totale de l'échantillon de sang utilisé doit être au moins équivalente à des taches circulaires de sang de 2 x 3mm. Par exemple, des taches de 1x 6mm peuvent être utilisées si cela convient.

La IsoCode Card™ - le dispositif d'isolation d'ADN pour le kit d'amplification (Schleicher et Schuell, Inc.) a été utilisée pour la préparation de l'ADN à partir des taches de sang et est également capable de produire des résultats interprétables.

Autres méthodes de préparation de l'ADN

Les méthodes de préparation de l'ADN décrites ci-dessus sont recommandées par Elucigene Diagnostics et sont reconnues pour produire des résultats constants et fiables. L'ADN préparé avec d'autres méthodes ou types d'échantillons risque de ne pas être optimal pour le test Elucigene CF30v2 et peut donner des résultats inférieurs. Les critères essentiels pour les méthodes alternatives de préparation de l'ADN sont une concentration optimale en ADN et une absence d'inhibiteurs de PCR.

Il est recommandé d'évaluer soigneusement les méthodes alternatives et les types d'échantillons avec le test Elucigene CF30v2 avant d'utiliser les résultats à des fins de diagnostic. Dans des conditions de PCR optimales, des bons résultats sont obtenus en utilisant des concentrations d'ADN entre 10 et 100ng/5µL. Il n'est pas recommandé d'utiliser une solution d'ADN à une concentration inférieure à 10ng/5µL. .

Protocole de test – Procédure d'amplification

Remarque: Afin de minimiser les risques de contamination, les étapes 4 à 7 doivent être effectués dans un lieu protégé de toute source d'ADN. Les mêmes précautions doivent être prises pour éviter la contamination par des produits de PCR.

1. Programmer le thermocycleur avec un cycle unique pour activer l'AmpliTaq Gold à 94°C pendant 20 minutes puis de 35 cycles d'amplification de 30 secondes à 94°C (dénaturation), 2 minutes à 58°C (hybridation) et 1 minute à 72°C (élongation) Terminer par une phase d'élongation finale de 20 minutes à 72°C

Remarque: Sélectionner l'option méthode 'Block', si elle est disponible, sur le thermocycleur pour le PCR dans des fioles de 0.5ml.

2. Un contrôle négatif doit être inclus dans chaque série de PCR.
3. Décongeler et centrifuger les mélanges d'amorces (TA, TB, TC, TD), l'AmpliTaq Gold (AG), les tubes de colorant de charge et de tampon de dilution (TP) pendant 10 secondes à 12 000g, mélanger doucement au vortex puis centrifuger à nouveau les tubes pendant 10 secondes.
4. Préparer suffisamment de dilutions d'AmpliTaq Gold avec le tampon de dilution et le colorant de charge fournis dans l'eau distillée stérile pour le nombre d'échantillons et de contrôles à tester. Pour 10 échantillons ou contrôles, pipeter 85µL d'eau déminéralisée stérile, 25µL du tampon de dilution, 125µL de colorant de charge et 15µL d'AmpliTaq Gold dans un tube de micro centrifugeuse. Mélanger minutieusement la dilution d'enzyme en la faisant doucement monter et descendre dans une pipette.
5. Préparer un mélange de réactions en ajoutant le volume nécessaire de mélange d'amorce à la dilution d'enzyme de l'étape 4. Pour 10 échantillons ou contrôles, pipeter séparément 165µL de chaque mélange d'amorces (A, B, C, et D) dans 55µL de dilution d'enzyme préparé dans l'étape 4 dans des tubes étiquetés. Mélanger minutieusement en faisant doucement monter et descendre le liquide dans une pipette.
6. Pipeter 20µL de chaque mélange de réaction au fond de chacune des fioles PCR nécessaires (à paroi mince) Fermer les tubes. Remarque : des tubes PCR de couleurs différentes permettent de faire la distinction entre les 4 mélanges d'amorces 'TA, TB, TC et TD'**.**
7. Etiqueté un tube de PCR de chaque couleur pour chaque échantillon et contrôle.
8. En changeant de pointe de pipette entre chaque échantillon, ajouter 5µL de l'échantillon de test dans chacune des 4 tubes PCR de couleur correspondante. Ajouter une goutte d'huile de vaseline blanche Sigma* si nécessaire[(c)] et refermer le capuchon fermement. Ne pas ajouter d'ADN à le tube PCR de contrôle négatif.

9. Centrifuger les tubes pendant 10 secondes à 12 000g.
10. Placer toutes les tubes dans le bloc du thermocycleur. Commencer le cycle unique d'activation à 94°C suivi du programme de cycle d'amplification.
11. Jeter toutes les dilutions d'AmpliTaq restantes non utilisées.
12. Une fois le programme de cycle d'amplification fini, les échantillons peuvent être conservés dans une pièce à température de 2-8°C pendant 7 jours au plus avant l'analyse par électrophorèse en gel.

[c] Pour les amplifications effectuées dans des tubes de PCR de 0.5ml ou un thermocycleur sans couvercle chauffant.

Electrophorèse en gel

Il est recommandé que chaque utilisateur s'assure que l'équipement choisi est utilisé en conformité avec les instructions données par le fabricant et est compatible avec ce test. Dans ce contexte, les paramètres clés sont les dimensions du peigne (formant les puits) et de la matrice gel. Les résultats ont été obtenus en utilisant les conditions d'électrophorèse suivantes:

1. Préparer un gel d'agarose NuSieve 3:1 à 3% dans du tampon TBE contenant du bromure d'éthidium Le TBE/EtBr a été préparé avec 134mM (16.2g/L) de la base Tris, 74.9mM (4.63g/L) d'acide borique, et un tampon d'EDTA 2.55mM (0.95g/L) avec 0.1μg/ml de bromure d'éthidium.
2. Versés dans un plateau de gel horizontal de 15 x 12cm avec des puits de 1.5mm x 5mm suspendus 1mm au-dessus de la base.
3. Déposer 15µl de la dilution du marqueur de taille et 15µl des produits de PCR obtenus. Chacun des tubes A, B, C et D doivent être placés dans des puits contigus pour une meilleure interprétation.
4. Un Marquer de taille (50bp) à 1.5μg/15μL a été préparée dans le colorant de charge fourni (80μL d'eau distillée / 10μL de colorant de charge / 10μL de l'échelle à 50 paires de base). Il faut noter que le mélange peut prendre une couleur orange avant d'être placé sur le gel.
5. Effectuer l'électrophorèse à 5 - 6 V/cm[d] entre les électrodes jusqu'à ce que le front coloré ait migré de 5cm des puits vers l'anode (1,5 à 2 heures)
6. Après l'électrophorèse, placer le gel sur un transilluminateur d'UV à 260nm pour visualisation et photographies.

[d] Calculer en utilisant la distance en centimètres entre les électrodes.

Interprétation des résultats

1. Le résultat du test ne sera interprétable que si les deux bandes témoins supérieure et inférieure sont clairement visibles pour chaque échantillon (voir figure 1). Leur position doit indiquer la taille moléculaire correcte :

   97 pb pour la bande inférieure des fioles A, B, C et 117 pb pour la fiole D

   423 pb, 526 pb respectivement pour les bandes supérieures des fioles A et B et 633 pb pour les fioles C et D (cf figure 4)..Le contrôle négatif ne devra présenter aucune bande. Le résultat d'un test de diagnostic ne doit pas être interprété si une bande similaire apparaît également dans le contrôle négatif pour la série de PCR, car ceci est une indication de contamination par un génomique d'ADN ou de produits de PCR

Si un des points décrits ci-dessus n'est pas observé, les résultats ne doivent pas être interprétés et il faut procéder à un autre test.

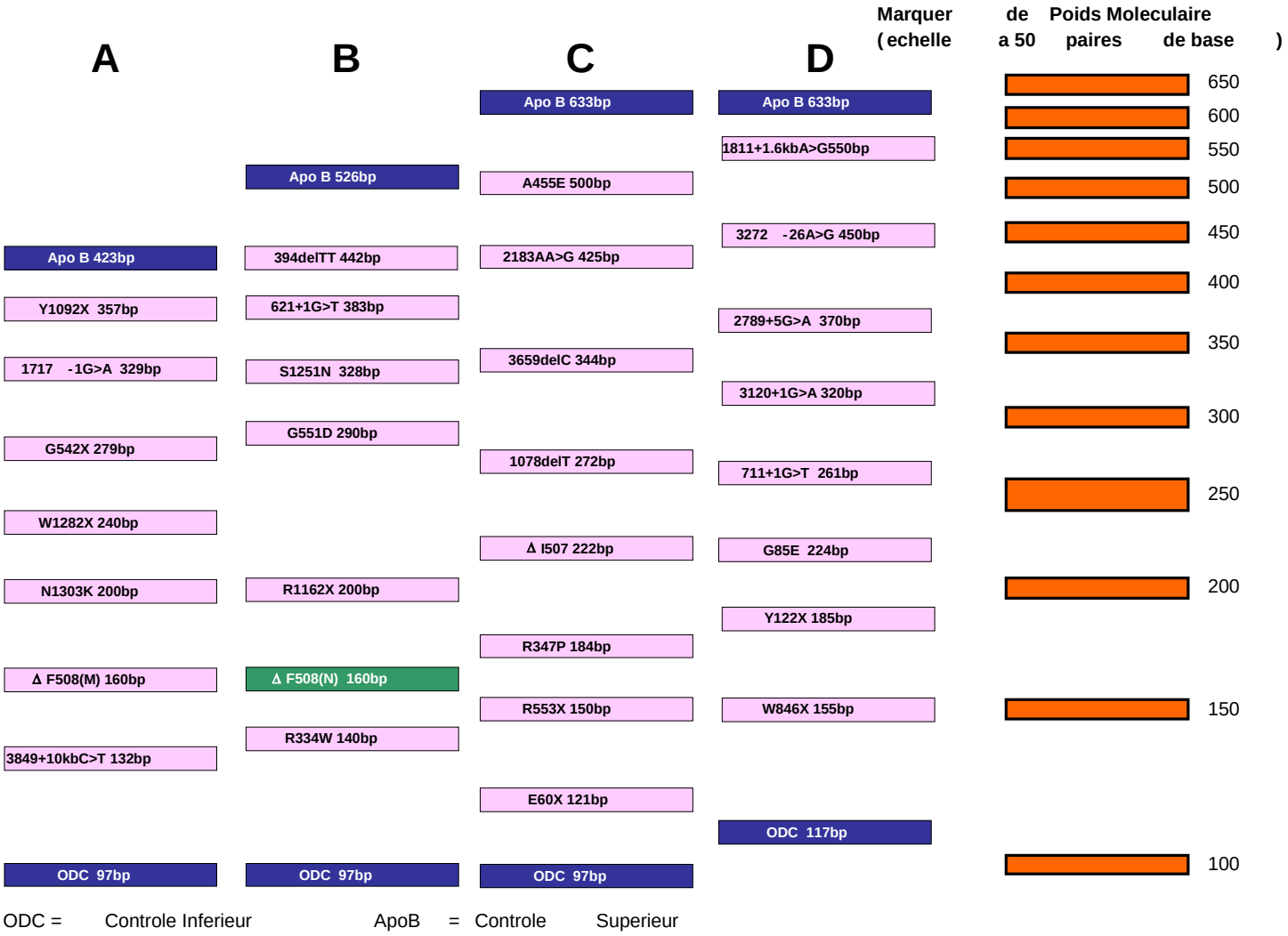
1. Un individu a deux copies du gène CFTR. Lorsque ces copies ont la même séquence à une position donnée, l'individu est alors décrit comme étant homozygote pour cette position. Lorsque les copies diffèrent en séquence à une position donnée, l'individu est alors décrit comme étant hétérozygote pour cette potition.
2. La présence de produit de PCR générée à partir de l'amorce normale F508del dans le tube B indique que l'échantillon contient la séquence normale pour ce site. Le produit de PCR normal sera observé dans la migration du tube B du gel à 160pb et est identifié par comparaison de position avec celles du marqueur de taille voisin.
3. Les produits de PCR des individus qui portent n'importe laquelles des mutations Y1092X, 1717-1G>A, G542X, W1282X, N1303K, F508del et 3849+10kbC>T sont observés dans la migration du tube A et sont identifiés par comparaison de taille avec celles du marqueur. Les tailles attendues des produit de PCR sont données dans la figure 1.
4. Les produits de PCR des individus qui portent n'importe laquelle des mutations 394delTT, 621+1G>T, S1251N, G551D, R1162X, et R334W sont observés dans la migration du tube B et sont identifiés par comparaison avec le marqueur de taille.
5. Les produits de PCR des individus qui portent n'importe laquelle des mutations A455E, 2183AA>G, 3659delC, 1078delT, I507del, R347P, R553X et E60X sont observés dans la migration du tube C et sont identifiés par comparaison avec le marqueur de taille .
6. Les produits de PCR des individus qui portent n'importe laquelle des mutations 1811+1.6kbG>A, 3272-26G>A, 3120+1G>A, 2789+5G>A, 711+1G>T, G85E, Y122X et W846X sont observés dans la migration du tube D et sont identifiées par comparaison avec le marqueur de taille

Seules les bandes correspondant à la taille attendue doivent être interprétées

Remarque: Etant donnée la complexité des mélanges d'amorces dans chaque tube, des artefacts correspondant à une taille de bande <97pb peuvent être visualisés dans les échantillons à tester et dans le contrôle.

La figure 1 illustre sur un diagramme les tailles attendues et l'emplacement respectif des produits de PCR dans le gel générés par la présence d'une mutation. Bien que toutes les combinaisons de mutations n'aient pas été évaluées, il est possible de détecter des hétérozygotes composites en utilisant le kit Elucigene CF30v2.

Figure 1



ODC = Controle Inferieur ApoB = Controle Superieur

Validation du Test

CF30 Version 1

30 échantillons assortis de sang entier et taches de sang séchées, dont les génotypes étaient connus, ont été testés en étude interne. L'ADN a été préparé en utilisant la méthode fournie dans ces Instructions d'Utilisation. Parmi les trente échantillons testés, six échantillons étaient normaux pour les 30 mutations testées par le kit, chacun des 24 autres échantillons visualisait au moins une des mutations détectées par CF30. Des hétérozygotes composés étaient détectés et tous les résultats étaient conformes au génotype connu obtenu par des méthodes alternatives.

Les échantillons de validation testés sont :

Héterozygotes – 2 x 3849+10kbC>T/+, 711+1G>T/+, 3272-26A>G/+, s1251N/+, R347P/+, R117H/+, R553X/+, ΔF508/+, 1811+1.6kbA>G/+, Y1092X/+, 1717-1G>A/+

Héterozygotes composés – Y122X/Δl507, R1162X/ΔF508, G551D/ΔF508, 711+1G>T/ΔF508, A455E/ΔF508, 1717-1G>A/ΔF508, R117H/ΔF508, W846X/ΔF508, R117H/ΔF508

Homozygotes – 6 x +/+, 2 x ΔF508/ΔF508

CF30 Version 2

Cette nouvelle version du kit apporte une modification au niveau du tube B. Le nouveau design ne comporte plus la mutation R117H. La validation a était réalisée avec un panel de 30 échantillons de sang total et taches de sang séchées sur le mix B. Parmi les 30 échantillons testés, 20 échantillons étaient normaux pour les six mutations comprises dans le mix B, les 10 autres contenaient au moins une des mutations détectées dans le mix B du kit CF30v2

Les échantillons de validation testés sont :

Héterozygotes – 2 x 394delTT/+, 621+1G>T/+, 2 x S1251N/+, 3 x G551D/+, R1162X/+, R334W/+

Homozygotes – 10 x +/+

Réactivité croisée

Des tests de réactivité croisée avec des polymorphismes et mutations décrites dans le gène *CFTR* ont été réalisés durant le développement du kit [8]. Le kit Elucigene CF30v2 est une extension d'Elucigene CF29v2 et les informations de réactivité croisée pour CF29v2 s'appliquent et sont incluses dans ces instructions.

Les mutations suivantes, rares, ont été évaluées par réactivité croisée et n'ont pas été détectées par le kit Elucigene CF29v2: R1283M, 1717-2A>G, R117C, 621+2T>C, R117L, I506V. De plus, les polymorphismes suivants n'ont pas été détectés par le test : 3617G/T, 1655T/G (F508C), 1651A/G.

L'évaluation des mutations et polymorphismes connus dans le gène CFTR a mis en relief les effets suivants sur les résultats du kit Elucigene CF30v2:

1. I507del en combinaison avec le dup1716+51>61 donnera un produit de PCR de 233pb dans le tube C plutôt que les 222pb attendues.
2. Une réactivité croisée légère de l'amorce R347P dans le tube C avec les mutations rares R347H a été observée avec les résultats dans un produit de PCR faible visible à la position de R347P dans le tube C.
3. Une mutation récemment reportée, 2184insG[12], peut en théorie réagir avec l'amorce 2183AA>G dans le tube C. Une bande correspondant à la mutation 2183AA>G peut indiquer la présence de la mutation 2184insG.
4. Une mutation récemment reportée, F316L[12], peut en théorie réagir avec l'amorce de la mutation 1078delT dans le tube C. Une bande de diagnostic 1078delT peut indiquer que la mutation F316L est présente.
5. Les mutations suivantes, qui n'ont pas été testées du fait de l'absence d'échantillons pourraient également présenter une récativité croisée : 621+2T>G, R553G, R553Q, R347L, I506T, I506S et la combinaison rare de I507del avec le polymorphisme 1651A/G.

Limites de la procédure

1. Les résultats obtenus à partir de ce kit de diagnostic ou tout autre diagnostic de réactif doivent être utilisés et interprétés seulement dans un contexte clinique. Elucigene Diagnostics Elucigene diagnostics n'est pas responsable des décisions cliniques qui peuvent être prises.
2. L'absence des 29 mutations détectées par ce kit ne garantit pas que d'autres variants du gène *CFTR* ne soient pas présentes. Beaucoup d'autres mutations non détectables par ce kit peuvent être présentes.
3. Les mutations présentent des fréquences différentes selon les populations. Ces données de fréquences sont disponibles au Consortium d'analyse génétique de la mucoviscidose (8).

L'utilisateur de ce kit doit insister sur ces points lorsqu'il présente les résultats à un clinicien de diagnostic ou à un consultant génétique.

Références

1. Welsh MJ *et al*. In Scriver CR *et al* (eds), The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. McGraw-Hill, New York: 3799-3876 (1995).
2. Elborn JS *et al*. Cystic Fibrosis: current survival and population estimates to the year 2000. Thorax **46**: 881-885 (1991).
3. Riordan JR *et al*. Identification of the Cystic Fibrosis Gene. Cloning and Characterization of Complementary DNA. Science **245**: 1066-1073 (1989).
4. Rommens JM *et al*. Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Chromosome Walking and Jumping. Science **245**: 1059-1065 (1989).
5. Le site internet des données de mutation de la fibrose cystique: *http://www.genet.sickkids.on.ca*
6. Newton CR *et al*. Analysis of any point mutation in DNA. The Amplification Refractory Mutation System (ARMS). Nucleic Acids Res **17**: 2503-2516 (1989).
7. Estivill X *et al*. Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. Hum Mut **10**:135-154 (1997).
8. Le Consortium de l'analyse génétique de la fibrose cystique. Hum Mutat **4**: 167- 177 (1994). Informations également disponibles sur: *http://www.genet.sickkids.on.ca*
9. Satsangi J *et al*. Effect of heparin on polymerase chain reaction. Lancet **343**: 1509-1510 (1994).
10. de Vries HG *et al*. Validation of the determination of ΔF508 mutations of the CF gene in over 11000 mouthwashes. Hum Genet **97**: 334-336 (1996).
11. Riley J *et al*. Rapid determination of DNA concentration in multiple samples. Nucleic Acids Res **17**: 8383 (1989).
12. Leoni GB *et al*. The Cystic Fibrosis Mutation Database website at: *http://www.genet.sickkids.on.ca* .

Elucigene est une marque déposée de Delta Diagnostics (UK) Ltd.

ARMS est une marque déposée d'AstraZeneca UK Ltd. NUSIEVE est une marque déposée de Lonza. AMPLITAQ GOLD est une marque déposée de Roche Molecular Systems Inc.

Copyright © 2014 Delta Diagnostics (UK) Ltd.